

Aus der 1. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses
Berlin - Neukölln

(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)
und

aus dem Institut für Hämatologie der GSF, München,
Assoziation mit EURATOM
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

Die Einwirkung von Serumdialysaten
nach Ammonsulfatfällung (Fraktion 2)
von Patienten mit hypersplenischen Milzen
auf menschliches Knochenmark in vitro.

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnarzt Eberhard Siegfried
aus Großwig

1973

Aus der 1. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses
Berlin - Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Hämatologie der GSF, München,
Assoziation mit EURATOM
(Leiter: Prof. Dr. W. Stich)

Die Einwirkung von Serumdialysaten
nach Ammonsulfatfällung (Fraktion 2)
von Patienten mit hypersplenischen Milzen
auf menschliches Knochenmark in vitro.

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnarzt Eberhard Siegfried
aus Großwig

Referent: Prof. Dr. med. Irene Boll

Korreferent: Prof. Dr. med. H. Michel

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-,
Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 26.1.1973

42542

Einleitung

1. Zusammenfassung

2. Zielsetzung

3. Methodik

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Untersuchung

4.2. Ergebnisse der Untersuchung

4.3. Ergebnisse der Untersuchung

4.4. Ergebnisse der Untersuchung

4.5. Ergebnisse der Untersuchung

5. Diskussion

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

Unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie

EURATOM - GSF, Nr. 031-64-1 BIAD



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALT

	Seite
Einleitung und Problemstellung	3
Fragestellung	6
Versuchsablauf	8
Patientengut	11
Ergebnisse	16
a) Reifungskurven	16
b) Signifikanzberechnung	24
c) Mitoseindex	34
d) Karyologische Kurven	41
e) G/E - Index	43
Zusammenfassung der Ergebnisse	44
Diskussion	45
Zusammenfassung	47
Literaturverzeichnis	48

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Seit mehreren Jahrzehnten ist bekannt, daß die Milz in autonome Vorgänge des Organismus eingreifen kann. Über ihren Einfluß auf die Hämatopoese hatte sich gezeigt, daß der Wirkmechanismus auf die periphere Blutzellzahl sowie auf das Knochenmark wahrscheinlich durch Substanzen humoraler Art in Gang gesetzt wird, die aber bisher in keiner Weise isoliert werden konnten.

Die klinischen Symptome der (Pan-) Zytopenie im Blut werden bei gleichzeitig bestehendem Milztumor unter dem Begriff des Hypersplenismus oder des Hyperspleniesyndroms zusammengefaßt. Anämie, Leukozytopenie und Thrombozytopenie sind meist alle drei, manchmal in verschiedener Kombination beteiligt (3). Für die Ursache der peripheren Zytopenie gibt es verschiedene Theorien.

Die gesteigerte erythrozytenzerstörende Funktion nach EPPINGER (1920) und die vermehrte Speicherung von Blutzellen nach DOAN (1949) wurde zu Gunsten der Theorie einer endokrinen Funktion der Milz entschieden: Bereits 1912 machte ISAAK (15) bei einer Anämie die innere Sekretion der Milz für die entstandene Knochenmarkfunktionshemmung verantwortlich.

Ähnlich beschrieben DAMESHEK und ESTREN 1947 (12) beim Hypersplenismus eine humorale Depression des Knochenmarks durch die Milz, was auch von RUHENSTROTH-BAUER 1964 (13) angenommen wird. Ein humoraler in der Milz gebildeter Wirkstoff gilt weiterhin als möglich (17), wenn auch ein für die humorale splenopathische Markhemmung notwendiges Hormon oder zerstörter knochenmark-

fördernder Stoff noch nicht nachgewiesen und identifiziert werden konnte.

In zahlreichen Untersuchungen wurde der Einfluß der Milz auf das Knochenmark gezeigt. Im Tierexperiment erzeugten BOCK und FRENZEL (5) an Kaninchen eine Proliferations- und Reifungshemmung im Knochenmark, nachdem sie die Milzvene unter Umgehung der Leber direkt in die Vena cava leiteten, wodurch der postulierte Milzwirkstoff nicht von der Leber abgeschwächt werden konnte. Auch HEILMEYER (14) fand beim Banti-Syndrom im Knochenmark eine Zellreifungshemmung bei Zunahme der unreifen Vorstufen. Nach Milzexstirpation bildete sich die Zytopenie rasch zurück und machte sogar einer Leukozytose Platz.

Durch eiweißfreie Extrakte von tierischen und menschlichen Hyperspleniemilzen erzeugten von ALBERT und ZICKGRAF (2) in Flüssigkeitskulturen von normalem menschlichen Knochenmark eine Regenerations- und Reifungshemmung der Granulocytopoese, wobei die Myelocyten und Promyelocyten bevorzugt gehemmt wurden. In diesen Versuchen zeigte sich, daß Knochenmarkkulturen zum Nachweis von hämatogen wirksamen Milzfaktoren geeignet sind, da die Kulturen frei von Gegenregulationen anderer Organe sind.

Zur Frage der Markhemmung haben BOLL und BAUCKS (8) die Kinetik des Knochenmarks von Patienten mit Milztumoren (Banti-Syndrom) nach dem Verhalten in der 3-Tage-Koagulum-Kultur und nach Differential- und Mitosezahlungen beurteilt und mit ihren aufgestellten Normwerten (10, 11) in Beziehung gesetzt. Aus den Untersuchungen ergibt sich für die Erythro- und Granulocytopoese eine in der Koagulumkultur darstellbare Reifungsstörung. Die herabgesetzte Proliferation der Hämatopoese bei zellreichem Knochenmark kann nicht durch vermehrten Zelluntergang im Milztumor erklärt

werden, da dieser völlig andere Veränderungen der Proliferation am gleichen Objekt hervorruft. Die Fibroadenie der Milz muß das Knochenmark auf andere Weise beeinflussen.

Auf der Suche nach einem Wirkstoff wurden von SCHULZ (20) Seren von zwei Patienten mit Banti-Syndrom (Patienten D. und G.) Knochenmarkkulturen zugesetzt. Er setzte den 3-Tage-Kulturen sowohl gefrorenes als auch nicht gefrorenes Serum beider Patienten zu. Nach Differential- und Mitosezählungen zeichneten sich bei Zusatz des Serums eine deutliche Reifungshemmung der Granulocytopoese bei allen Zelltypen ab, während die Erythrocytopoese, wie auch bei v. ALBERT, keine Beeinflussung zeigte. Das über vier Wochen gefrorene Serum zeigte dasselbe Ergebnis. Der somit im Serum vermutete auf das Knochenmark wirksame Faktor sollte durch Fraktionierung eingeengt werden.

FRAGESTELLUNG

In unseren Untersuchungen haben wir die Proliferationskinetik von Knochenmarkkulturen aufgezeichnet. Wir setzten Serumfraktionen der Patienten D. und G. (entsprechend D-2 und G-2), die das Banti-Syndrom aufwiesen, Knochenmarkkulturen zu und verglichen mit Kontrollkulturen ohne Zusatz. Hierbei legten wir auf folgende Feststellungen wert:

- 1) Beurteilung der Reifung der Granulo- und Erythrocytopoese in vitro während 72 Stunden nach der Differentialzählung.
- 2) Änderung der Mitosehäufigkeit in der Granulo- und Erythrocytopoese.
- 3) Häufigkeit einzelner Mitosephasen.
- 4) Relatives Verhalten von Granulo- zu Erythrocytopoese.
- 5) Rückschlüsse auf einen knochenmarkwirksamen Milzfaktor bei Veränderungen gegenüber den Kontrollwerten.

Um diese Feststellungen treffen zu können, haben wir von den Kulturen mit und ohne Zusatz folgendes ermittelt:

- a) Die Reifungskurven der roten und weißen Reihe in den Kulturen mit Stichproben nach 24, 48 und 72 Stunden.
- b) Die Mitoseindices nach 24, 48 und 72 Stunden, getrennt für die Granulo- und Erythrocytopoese.
- c) Die karyologischen Kurven der Mitosephasen, getrennt für die Granulo- und Erythrocytopoese.
- d) Eine Tabelle der G/E-Indices, aus der das relative Verhältnis aller weißen zu allen roten Vorstufen ersichtlich ist.

Aufgrund dieser Darstellung läßt sich die Proliferation unterteilen in

- a) Regeneration, gemessen am Mitoseindex (M-I) und den karyologischen Kurven und
- b) Reifung, gemessen am G/E-Index (G/E-I) und den Reifungskurven.

VERSUCHSABLAUF

Die den Kulturen zugesetzten Serumfraktionen D-2 und G-2 der Patienten D. und G. entstanden folgendermaßen:

5 ml Serum (jeweils vom Patienten D. und G.) wurden bei Zimmertemperatur mit 5 ml einer gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung versetzt, d. h. es wurde eine Halbsättigung mit Ammonsulfat herbeigeführt. Die Fällung kam durch Zutropfenlassen während einer Stunde unter dauerndem Rühren zustande. Nach zwei Stunden Ruhezeit wurde die Mischung hochtourig abzentrifugiert. Der dabei entstandene Niederschlag wurde mit 5 ml physiologischer NaCl-Lösung (pH 7,2) gelöst und zweimal gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert. Das Dialysat wurde gefriergetrocknet und stellte nach Auflösen mit der Ausgangsmenge Aqua bidest. die Zusätze D-2 bzw. G-2 dar.

Die Gewinnung des Knochenmarks erfolgte durch routinemäßige Sternalpunktion verschiedener Patienten mit unterschiedlichen, aber nicht leukämischen Erkrankungen.

Die Kultivierung des Knochenmarks wurde nach der Carrel-Deckglaskulturmethode, modifiziert nach BOLL (9), durchgeführt. Das zur Koagulation gebrachte Medium bestand in den Kontrollkulturen aus

50 % Nativplasma des betreffenden Patienten
40 % Eigenserum
10 % Corrhormon (R), 3fach verstärkt,
(Fa. Chemiewerke, Homburg)

in den Zusatzkulturen aus

50 % Nativplasma des betreffenden Patienten
40 % fraktioniertes D-2- bzw. G-2-Serum
10 % Corrhormon ^(R), 3-fach verstärkt.

Nach Aufsetzen eines Knochenmarkbröckchens auf das Koagulum im Hohlschliffobjektträger (hängender Tropfen) wurde es mit einem Serumtröpfchen (homolog bzw. D-2 oder G-2) überschichtet, mit Hartparaffin verschlossen und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die Ausstriche wurden sofort nach der Sternalpunktion und von den Kulturen mit homologem bzw. fraktioniertem Fremd-Serum nach 24, 48 und 72 Stunden angefertigt und nach Pappenheim gefärbt.

Die Zellen der Präparate wurden in den aufgelockerten Randzonen mäanderförmig ausgezählt. Um eine gleichmäßige Zellverteilung zu erhalten, wurden aus jedem Präparat nach Empfehlung von BOLL und FUCHS (9) 2000 Zellen ausgezählt. Insgesamt habe ich etwa 70 000 Zellen gezählt, davon ca. 43 000 der weißen, 18 000 der roten Reihe und 9000 übrige Zellen wie Reticulumzellen, Lymphocyten, Plasmazellen und Megakaryocyten.

In der Erythrocytopoese wurden folgende Zellen differenziert und in den graphischen Darstellungen und Berechnungen mit Abkürzungen versehen:

- | | |
|-----------------------------------|------|
| 1. Proerythroblast | = PE |
| 2. basophiler Erythroblast | = bE |
| 3. polychromatischer Erythroblast | = pE |
| 4. oxyphiler Erythroblast | = oE |
| 5. reifer Erythroblast | = rE |

In der Granulocytopoese wurden folgende Zellen differenziert:

1. Myeloblast	= Mb
2. Promyelocyt	= Pr
3. neutrophiler Myelocyt	= My
4. eosinophiler Myelocyt	= eMy
5. basophiler Myelocyt	= -
6. Promonocyt	= Pmo
7. Metamyelocyt	= MM
8. stabkerniger Granulocyt	= St
9. neutrophiler segmentkerniger Granulocyt	= Se
10. eosinophiler segmentkerniger Granulocyt	= eSe
11. basophiler segmentkerniger Granulocyt	= -
12. Monocyt	= Mz

Da BOLL und Mitarbeiter (6, 10) die Kriterien, die zur Differenzierung der einzelnen Zellen zugrunde gelegt sind, beschrieben haben, möchte ich an dieser Stelle darauf verzichten.

Die Zellen 1 - 4 der Erythrocytopoese und 1 - 7 der Granulocytopoese werden als teilungsfähig zur Berechnung der Mitoseindices angesehen. Die Mitosephasen sind nach BOLL (6) eingeteilt in:

Prophase	= P
frühe Metaphase	= fM
späte Metaphase	= sM
Anaphase	= A
Telophase	= T
Rekonstruktionsphase	= R

PATIENTENGUT

Es wurden Knochenmarkkulturen von fünf Patienten untersucht. Nach der Sternalpunktion, bei der genügend Mark für Parallel-Ansätze aspiriert wurde, sind die Ausstrichpräparate angefertigt und ausgezählt worden. Auf die ersten beiden Patienten wurden die Zusätze D-2, auf den dritten Patienten D-2 und G-2 (bei einer gezählten Kontrolle) und auf die letzten beiden Patienten die Zusätze G-2 angesetzt, so daß bei fünf Patienten sechs Fälle ausgewertet wurden. Im folgenden werden diese sechs Fälle mit 1. Patient bis 6. Patient bezeichnet.

1. Patient: A.P., 49 Jahre, männlich

Diagnose: Verdacht auf toxische Markschädigung. Stationäre Einweisung wegen Kollaps aufgrund einer Intoxikation mit Trichloräthylen-Lösungsdämpfen nach einer Arbeit mit Kautschuklack.

Peripheres Blutbild bei der Aufnahme 28.1.71:

Hb	10,1 g %
Erythrocyten	2,96 Mill/mm ³
HbE	33,6 pg
Leukocyten	10 600/mm ³
Eosinophile	3 %
Segmentkernige	65 %
Lymphocyten	28 %
Monocyten	4 %
Thrombocyten	70 000/mm ³
BSG	23/50 mm n.W.
Eisenspiegel im Serum	72 µg %

Knochenmark-Diagnose: Toxisch bedingte Markschädigung, da eine der Anämie entsprechende Steigerung der Erythrocytopoese fehlt.

2. Patientin: E. G., 53 Jahre, weiblich

Diagnose: Verdacht auf unbehandelte Perniciosa. Die Patientin war in ambulanter Behandlung.

Blutbild vom 15.2.71:

Erythrocyten	4,0 Mill/mm ³
Hb	13,9 g %
HbE	34,8 pg
Leukocyten	8 100/mm ³
Eosinophile	3 %
Stabkernige	1 %
Segmentkernige	69 %
Lymphocyten	24 %
Monocyten	3 %
Thrombocyten	240 000/mm ³
BSG	30/56 mm n.W.
Eisenspiegel im Serum	124 µg %

Knochenmark-Diagnose: Reichliches Vorkommen von Megaloblastoiden und übersegmentierten Megakaryocyten.

3. Patientin: F. B., 82 Jahre, weiblich

4. Patientin: F. B., 82 Jahre, weiblich

Diagnose: Beginnendes Plasmocytom. Stationäre Einweisung mit einer stark beschleunigten BSG von 108/143 und einer Anämie. Medikation zur Zeit der Sternalpunktion: Kobaltferrlecit (R) 80 mg/d i.v.

Blutbild

Erythrocyten	2,52 Mill/mm ³
Hb	6,2 g %
HbE	24,5 pg
Leukocyten	8 200/mm ³
Eosinophile	1 %
Segmentkernige	84 %
Lymphocyten	9 %
Monocyten	6 %
Thrombocyten	472 000/mm ³
Eisenspiegel im Serum	52,3 µg %

Elektrophorese (Serum)

	Normalwerte	rel. %	g %
A	54,4-69,9	39,81	2,09
α_1	1,2- 5,1	6,14	0,33
α_2	4,5-10,8	12,9	0,70
β	8,1-12,9	15,95	0,85
γ	9,9-19,5	25,20	1,35
Eiweiß	6,6- 8,2g %	-	5,32

Immunelektrophorese

γ -A-Paraproteinämie wie bei Plasmocytom mit sekundärer Verminderung der Immunglobuline IgM und IgG und der Albumine. Hiermit wurde die Diagnose eines γ -A-Plasmocytoms gesichert.

Knochenmark-Diagnose: Plasmazellvermehrung, keine Steigerung der Erythrocytopoese entsprechend der Anämie.

5. Patient : W. T., 27 Jahre, männlich

Stationäre Einweisung erfolgte wegen Hypertonus, außerdem bestand Alkoholabusus.

Blutbild

Hämatokrit	47 %
Erythrocyten	5,1 Mill/mm ³
Hb	15,4 g %
Hb _E	30,2 pE
Leukocyten	10 300/mm ³
Basophile	2 %
Eosinophile	1 %
Stabkernige	5 %
Segmentkernige	69 %
Lymphocyten	18 %
Monocyten	5 %
Thrombocyten	190 000/mm ³
BSG	3/13 mm n. W.

Medikation: Distraneurin^(R)

Knochenmark-Diagnose: Normaler Knochenmarkbefund, Vermehrung von Sideroblasten und Siderocyten.

6. Patient : R. Th., 31 Jahre, männlich

Diagnose: Verdacht auf Thalassaemia minor.
Die Hämoglobinanalyse bestätigte die Diagnose durch vermehrte HbA₂ (6,7% statt 3%).

Blutbild

Erythrocyten	4,9 Mill/mm ³
Hb	12,2 g %
HbE	24,7 pg
Leukocyten	7 700/mm ³
Eosinophile	5 %
Basophile	2 %
Segmentkernige	55 %
Monocyten	1 %
Lymphocyten	37 %
Thrombocyten	178 000/mm ³
BSG	2/2mm n.W.
Eisenspiegel im Serum	190 µg %

Der Patient war in ambulanter Behandlung und hatte keine Medikation zur Zeit der Sternalpunktion.

Knochenmark-Diagnose: Vereinzelte PAS-positive Erythroblasten und Proerythroblasten, einzelne Targetzellen.

Die beiden Patienten mit Banti-Syndrom, deren Seren fraktioniert wurden, hatten zur Zeit der Serumentnahme folgende Blutwerte.

Patientin : K. D. (D-2), 55 Jahre, weiblich

Diagnose: Splenomegale Markhemmung mit hämorrhagischer Diathese bei Lebercirrhose.

Blutbild vom 29.9.70

Erythrocyten	4,28 Mill/mm ³
Hb	14,1 g %
HbE	32,8 pg
Leukocyten	4 600/mm ³
Eosinophile	2 %
Segmentkernige	50 %
Lymphocyten	44 %
Monocyten	4 %
Thrombocyten	26 000/mm ³
BSG	9/18 mm n.W.
Eisenspiegel im Serum	220 µg %

Elektrophorese (Serum)

	Normalwerte	rel. %
A	40-50	30,8
α ₁	3- 9	8,8
α ₂	8-12	14,0
β	12-18	12,4
γ	22-26	34,0

Knochenmark-Diagnose: Angeregte Retikulo-
poese und Erythrocytopoese, Megakaryopoese
unauffällig.

Patientin : K. G. (G-2), 75 Jahre, weiblich

Diagnose: Milztumor ohne nachweisbaren
Leberschaden.

Blutbild vom 8.6.70

Erythrocyten	4,18 Mill/mm ³
Hb	12,6 g %
HbE	30,0 pg
Leukocyten	4 800/mm ³
Eosinophile	2 %
Stabkernige	1 %
Segmentkernige	44 %
Lymphocyten	48 %
Monocyten	5 %
Thrombocyten	158 000/mm ³
Eisenspiegel im Serum	107,9 µg %

Knochenmark-Diagnose: Monocytäre Reaktion.

ERGEBNISSE

a) Reifungskurven

Aus der Differentialzählung der Hämatopoese wurden Reifungskurven für die sechs Patienten angefertigt.

(Abb. 1 - 6)

————— = Kontrollkulturen

----- = Zusatzkulturen

In der allgemeinen Betrachtung der Kurven fällt auf, daß nach dem Zusetzen der Fraktionen D-2 und G-2 bei der Erythrocytopoese eine Linksverschiebung, das heißt also eine Reifungsförderung eintritt, und bei der Granulocytopoese eine leichte Rechtsverschiebung, das heißt eine geringe Reifungshemmung. Dies wird nachstehend ausführlich beschrieben.

In der Erythrocytopoese scheinen die Fraktionen D-2 und G-2 mit unterschiedlicher Intensität zu wirken, da die Reifungsförderung bei Patient 5 (G-2) nur gering ist und bei Patient 6 erst nach 48 Stunden eintritt. Die deutlichste Reifungsförderung tritt bei den Patienten 1, 2, 5, 6 nach 48 Stunden auf und umfaßt besonders die reifen und oxyphilen Erythroblasten, während bei den Patienten 3 und 4 das Maximum schon bei 24 Stunden liegt.

Sämtliche Kurven wurden auf ihre Signifikanz berechnet (Tabelle C). Es ergaben sich hoch signifikante Werte, außer bei Patient 2 für 72 Stunden und bei Patient 3 und 4 für 48 und 72 Stunden.

In der Granulocytopoese sind die Abweichungen geringer. Eine leichte Reifungshemmung zeigt sich bei den Patienten

1, 4, 5, 6 nach 24 Stunden, bei den Patienten 2 und 3 nach 48 Stunden. Gehemmt werden besonders die Metamyelocyten, stabkernigen und segmentkernigen Granulocyten, während die Myelocyten beträchtlich zunehmen.

Sämtliche Kurven wurden auf ihre Signifikanz berechnet (Tabelle D). Alle Kurven zeigen hohe Signifikanz.

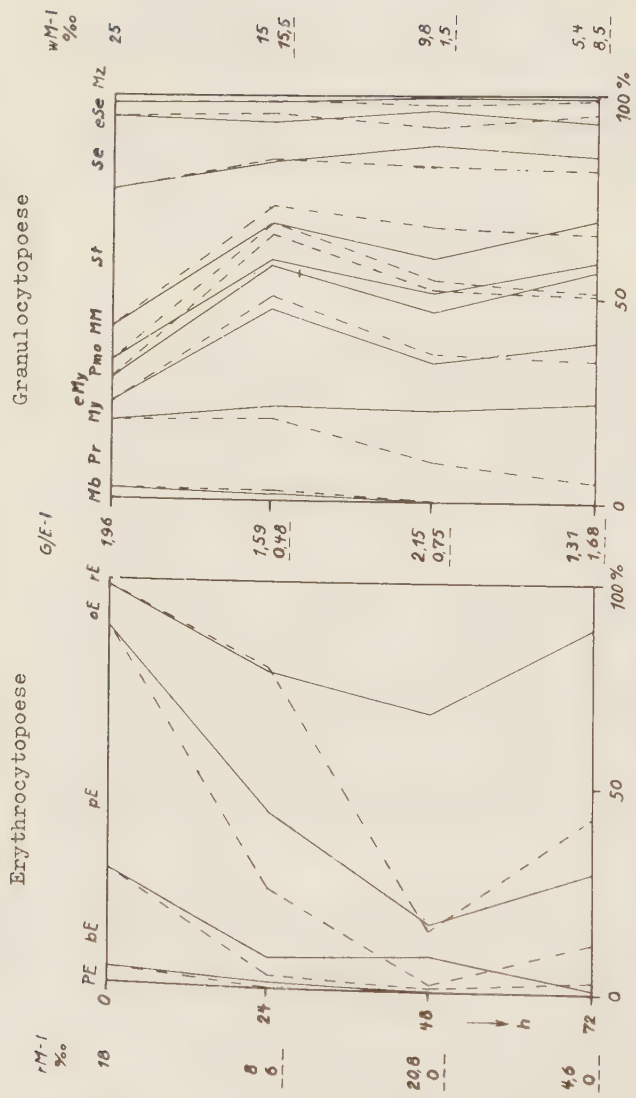


Abb.1 Reifungskurven der Erythro- und Granulocytopoese: Patient 1

Abzissen: additive Anordnung der einzelnen Zellarten getrennt für Erythro- und Granulocytopoese.

Ordinaten: Zeit in Stunden.

$rM-I$ = roter Mitoseindex, $wM-I$ = weißer Mitoseindex, $G/E-I = G/E - Index$

— = Kontrollkulturen, - - - - - = Zusatzkulturen

Zeichenerklärung siehe Seiten 9 und 10, Erläuterungen siehe Seite 16

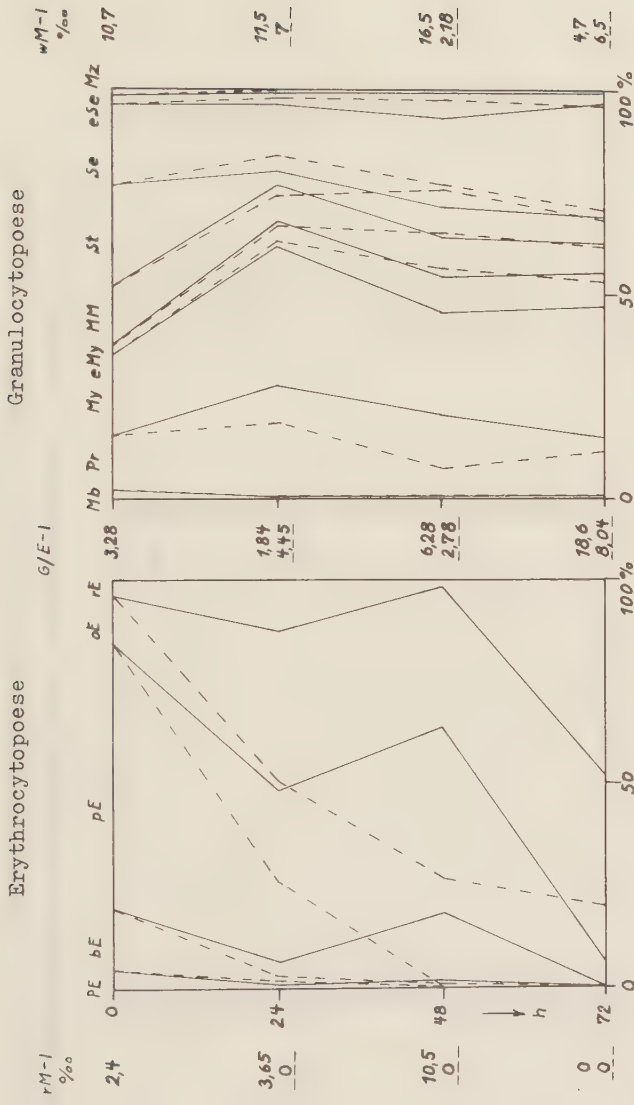


Abb.2 Reifungskurven der Erythro- und Granulocytopoese: Patient 2
Abszissen, Ordinaten, Zeichenerklärung und Erläuterungen siehe Seite 18

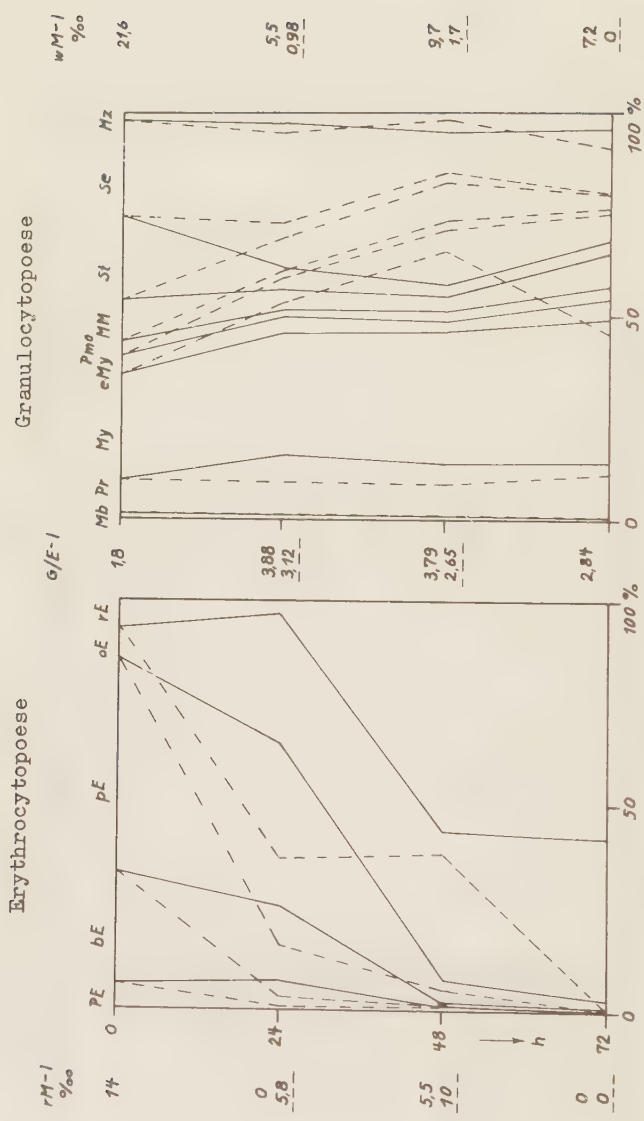


Abb. 3 Reifungskurven der Erythro- und Granulocytopenie: Patient 3
 Abzissen, Ordinaten, Zeichenerklärung und Erläuterungen siehe Seite 18

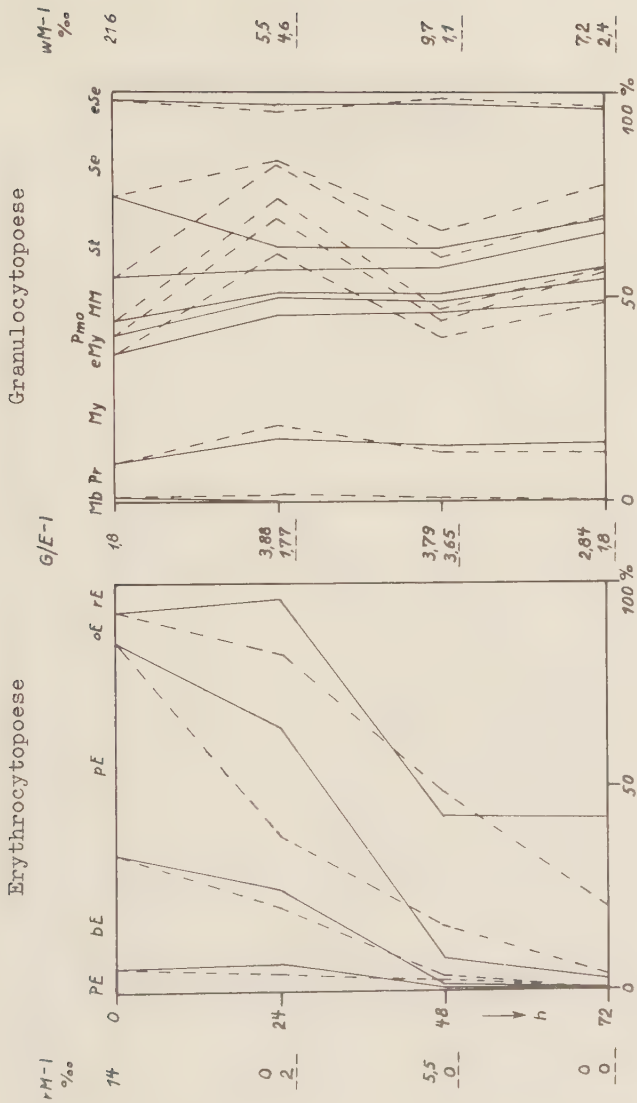


Abb.4 Reifungskurven der Erythro- und Granulocytopenie: Patient 4
Abszissen, Ordinaten, Zeichenerklärung und Erläuterungen siehe Seite 18

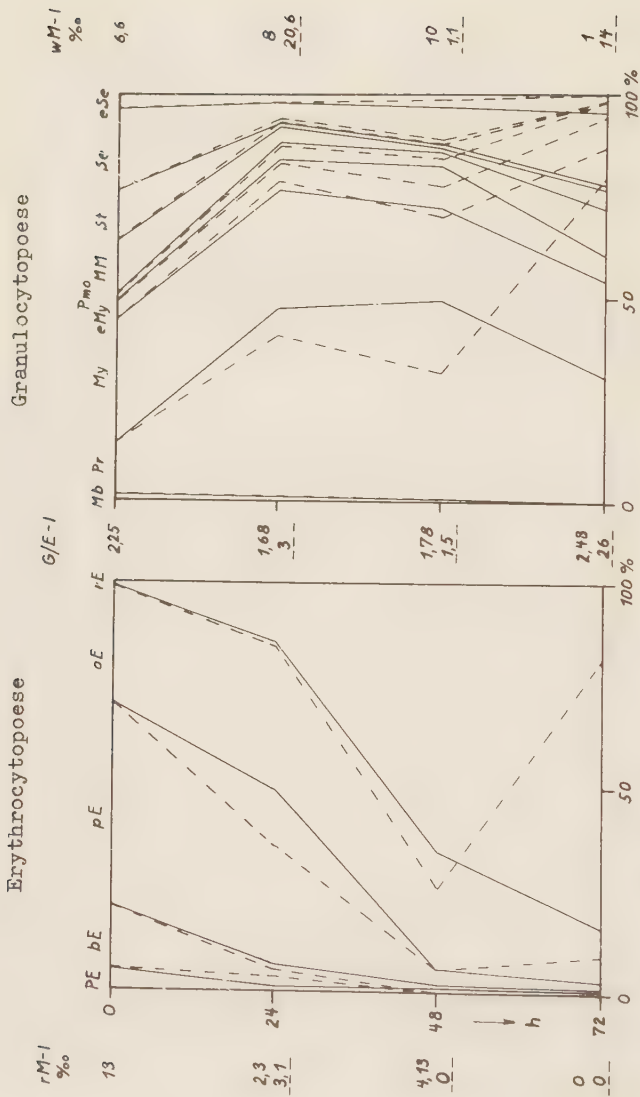


Abb. 5 Reifungskurven der Erythro- und Granulocytopoese: Patient 5
Abzissen, Ordinaten, Zeichenerklärung und Erläuterungen siehe Seite 18

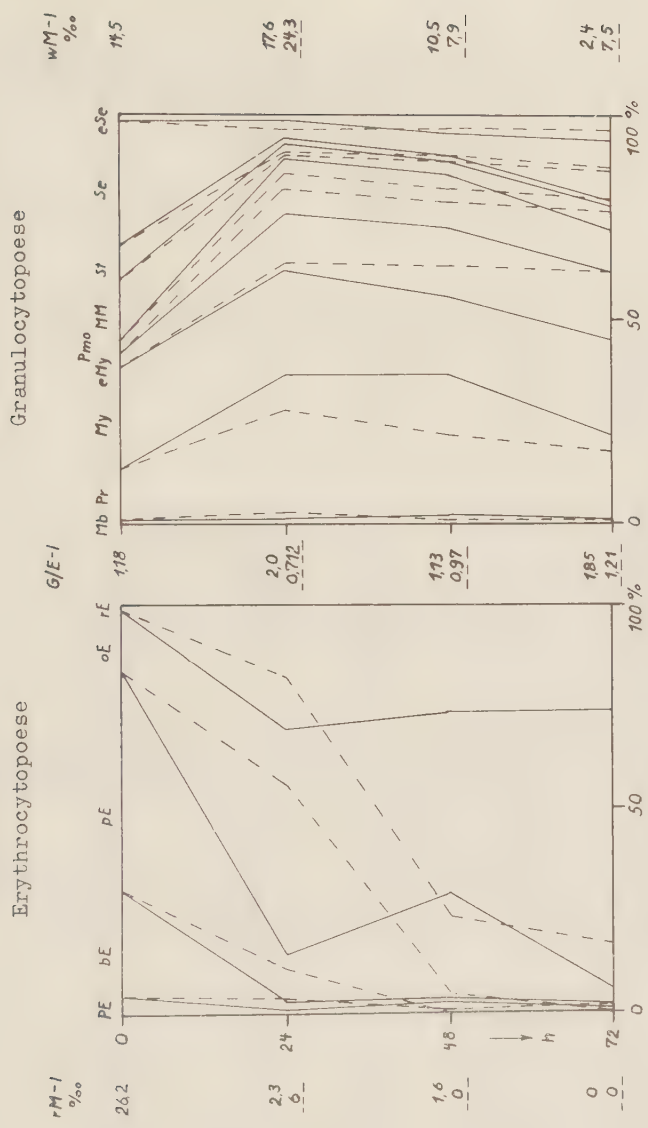


Abb.6 Reifungskurven der Erythro- und Granulocytopenie: Patient 6
 Abszissen, Ordinaten, Zeichenerklärung und Erläuterungen siehe Seite 18

b) Signifikanzberechnung

Die Signifikanzberechnung für die Werte der Reifungskurven und der Mitoseindices wurde mit dem χ^2 -Verfahren nach HELMERT PEARSON durchgeführt. (4)

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\chi^2_{FG} = \sum \frac{(B-E)^2}{E} ,$$

wobei B die beobachteten Zellzahlen der Kontroll- bzw. Zusatzkulturen bedeutet, E die entsprechenden Erwartungswerte, FG die Anzahl der Freiheitsgrade. Die Erwartungswerte berechnen sich aus

$$E = n \times p ,$$

wobei n die Summe der Beobachtungswerte und p die relative Häufigkeit der vereinigten Stichprobe bedeuten. Die Ermittlung der P-Werte (Wahrscheinlichkeit) erfolgt aus den von PÄTAU (4) konstruierten graphischen Tafeln. Bei $P < 0,0027$ gilt die Differenz als statistisch gut gesichert.

Für die Erythrocytopoese mit fünf differenzierten Formen der einzelnen Zellen wurden vier Freiheitsgrade, für die Granulocytopoese mit zehn differenzierten Zellformen neun Freiheitsgrade berücksichtigt.

Für die Erythrocytopoese gelten die Werte als signifikant, wenn $\chi^2_{Ery} \geq 16$ ist und für die Granulocytopoese bei $\chi^2_{Gran} \geq 25,5$.

TABELLE C

Erythrocytopoese: Patient 1

24 Std.

Zell- typ	B		E		(B-E) ² /E	
	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz
PE	10	15	9,6	15,3	0	4,90
bE	50	24	28,4	45,5	16,30	10,18
pE	285	270	213,4	341,5	23,99	14,99
oE	286	681	371,8	595,1	19,83	12,39
rE	177	287	178,4	285,5	0	0
	798	1277			$\chi^2 = 97,75$	

48 Std.

PE	0	1	0,3	0,6	0,30	0,13
bE	49	2	15,4	35,5	72,42	31,61
pE	43	7	15,1	34,8	50,88	22,21
oE	292	161	137,6	315,3	173,05	75,54
rE	180	1121	395,3	905,6	117,30	51,20
	564	1292			$\chi^2 = 594,67$	

72 Std.

PE	1	0	0,3	0,6	1,05	0,62
bE	4	22	9,6	16,3	3,33	1,97
pE	137	74	78,5	132,4	43,44	25,77
oE	288	250	200,3	337,6	38,34	22,75
rE	53	468	194,0	326,9	102,49	60,81
	483	814			$\chi^2 = 300,62$	

Erythrocytopoese: Patient 2

24 Std.

PE	6	4	7,0	2,9	0,15	0,36
bE	34	4	26,7	11,2	1,95	4,66
pE	264	60	228,1	95,8	5,61	13,38
oE	243	65	216,9	91,0	3,13	7,46
rE	77	123	155,0	60,2	31,24	76,09
	624	262			$\chi^2 = 144,79$	

48 Std.

PE	3	0	0,9	2,0	4,84	2,09
bE	32	2	10,2	23,7	46,02	19,90
pE	88	0	26,5	61,4	142,06	61,43
oE	66	117	55,2	127,7	2,09	0,99
rE	7	32	22,0	22,2	23,10	40,26
	192	444			$\chi^2 = 412,74$	

Fortsetzung TABELLE C

Erythrocytopoese: Patient 3

24 Std.

Zell- typ	B		E		(B-E) ² /E	
	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz
PE	28	2	14,0	15,9	13,72	12,15
bE	74	10	39,4	44,5	30,22	26,78
pE	164	61	105,7	119,2	32,15	28,48
oE	132	99	108,5	122,4	5,08	4,50
rE	14	293	144,2	162,7	117,58	104,18
	412	465			$\chi^2 = 374,88$	

48 Std.

PE	3	4	4,3	2,6	0,40	0,66
bE	2	2	2,4	1,5	0,09	0,14
pE	28	7	21,6	13,3	1,85	3,01
oE	148	87	145,4	89,5	0,04	0,07
rE	246	163	253,1	155,8	0,19	0,32
	427	263			$\chi^2 = 6,82$	

Erythrocytopoese: Patient 4

24 Std.

PE	28	25	21,5	31,4	1,92	1,32
bE	74	98	69,9	102,0	0,23	0,16
pE	164	109	111,0	161,9	25,26	17,32
oE	132	266	161,8	236,1	5,51	3,77
rE	14	103	47,5	69,4	23,70	16,24
	412	601			$\chi^2 = 95,47$	

48 Std.

PE	3	9	6,1	5,8	1,59	1,65
bE	2	5	3,5	3,4	0,69	0,71
pE	28	51	40,3	38,6	3,75	3,91
oE	148	134	143,8	138,1	0,11	0,12
rE	246	211	233,1	223,8	0,70	0,73
	427	410			$\chi^2 = 14,01$	

72 Std.

PE	1	0	0,4	0,5	0,56	0,52
bE	6	12	8,6	9,3	0,79	0,73
pE	90	55	69,4	75,5	6,10	5,60
oE	207	264	225,4	245,5	1,51	1,39
	304	331			$\chi^2 = 17,22$	

Fortsetzung TABELLE C

Erythrocytopoese: Patient 5

24 Std.

Zell- typ	B		E		(B-E) ² /E	
	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz
PE	12	15	19,5	7,4	2,88	7,51
bE	56	5	44,0	16,9	3,23	8,40
pE	423	117	390,1	149,8	2,77	7,21
oE	370	188	547,5	210,4	0,91	2,38
rE	141	60	145,2	55,7	0,12	0,31
	1002	385			$\chi^2 = 35,77$	

48 Std.

PE	8	0	3,9	3,9	4,19	3,95
bE	6	0	2,9	2,9	3,14	2,96
pE	26	38	31,4	31,6	0,95	1,28
oE	202	144	170,2	170,9	5,92	4,25
rE	570	533	493,5	495,6	1,12	2,82
	712	715			$\chi^2 = 30,61$	

72 Std.

PE	2	0	1,9	0,0	0,00	0,04
bE	3	0	2,9	0,0	0,00	0,06
pE	8	1	8,8	0,1	0,07	3,60
oE	71	8	77,3	1,6	0,52	25,16
rE	442	2	434,9	9,0	0,11	5,53
	526	11			$\chi^2 = 35,13$	

Erythrocytopoese: Patient 6

24 Std.

PE	6	41	15,9	31,0	6,19	3,18
bE	12	86	33,2	64,7	13,56	6,96
pE	72	554	212,2	413,7	92,70	47,57
oE	347	324	227,5	443,4	62,70	32,17
rE	188	213	135,9	265,0	19,89	10,20
	625	1218			$\chi^2 = 225,16$	

48 Std.

PE	20	6	11,7	14,2	5,71	4,74
bE	11	0	4,9	6,0	7,24	6,01
pE	220	39	117,4	141,5	89,47	74,26
oE	377	193	258,5	311,4	54,27	45,05
rE	227	792	462,1	556,8	119,68	99,35
	855	1030			$\chi^2 = 505,81$	

72 Std.

PE	1	5	2,8	3,1	1,22	1,13
bE	6	1	3,3	3,6	2,06	1,91
pE	27	0	12,9	14,0	15,18	14,08
oE	398	103	240,6	260,3	102,89	95,10
rE	154	525	326,1	352,8	90,85	83,98
	586	634			$\chi^2 = 408,39$	

TABELLE D

Granulocytopoese: Patient 1

24 Std.

Zell- typ	B		E		(B-E) ² /E	
	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz
Mb	18	13	20,8	10,1	0,38	0,78
Pr	273	110	257,2	125,7	0,96	1,97
My	306	191	333,8	163,1	2,31	4,73
eMy	139	94	156,4	76,5	1,95	3,99
Pmo	12	12	16,1	7,8	1,05	2,15
MM	117	29	98,0	47,9	3,65	7,48
St	191	73	177,3	86,6	1,05	2,16
Se	122	72	130,2	63,7	0,52	1,08
eSe	72	16	59,1	28,8	2,81	5,74
Mz	10	6	10,7	5,2	0,05	0,10
	1260	616			$\chi^2 = 45,01$	

48 Std.

Mb	2	2	2,2	1,7	0,02	0,02
Pr	266	88	196,9	157,0	24,20	30,35
My	142	259	223,1	177,8	29,48	36,97
eMy	153	153	170,2	135,7	1,74	2,19
Pmo	41	22	35,0	27,9	1,00	1,26
MM	106	128	130,1	103,8	4,49	5,63
St	332	150	268,1	213,8	15,19	19,05
Se	101	92	107,3	85,6	0,37	0,47
eSe	47	55	56,7	45,2	1,67	2,10
Mz	19	15	18,9	15,0	0,00	0,00
	1209	964			$\chi^2 = 176,29$	

72 Std.

Mb	2	6	3,4	4,5	0,61	0,46
Pr	195	44	103,3	135,6	81,20	61,89
My	117	312	185,5	243,4	25,32	19,30
eMy	139	165	131,4	172,5	0,42	0,32
Pmo	20	10	12,9	17,0	3,80	2,89
MM	85	167	108,9	143,0	5,28	4,02
St	126	168	127,1	166,8	0,01	0,00
Se	65	143	89,9	118,0	6,92	5,25
eSe	51	38	38,4	50,5	4,06	3,09
Mz	11	12	9,9	13,0	0,11	0,08
	811	1064			$\chi^2 = 225,18$	

Fortsetzung TABELLE D

Granulocytopoese: Patient 2

24 Std.

Zell- typ	B		E		(B-E) ² /E	
	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz
Mb	6	4	4,9	5,0	0,21	0,21
Pr	310	213	259,3	263,6	9,89	9,72
My	388	518	449,2	456,7	8,35	8,22
eMy	67	45	55,5	56,4	2,36	2,32
Pmo	24	3	13,3	13,6	8,40	8,27
MM	76	70	72,4	73,5	0,17	0,17
St	40	115	76,8	78,1	17,67	17,39
Se	196	169	181,0	183,9	1,24	1,22
eSe	36	30	32,7	33,2	0,32	0,32
Mz	5	0	2,4	2,5	2,56	2,52
	1148	1167				

$$\chi^2 = 101,62$$

48 Std.

Mb	13	6	10,7	8,2	0,48	0,62
Pr	312	83	222,8	172,1	35,68	46,18
My	400	615	572,5	442,4	52,01	67,32
eMy	144	87	130,3	100,6	1,43	1,86
Pmo	16	36	29,3	22,6	6,06	7,84
MM	143	91	132,0	101,9	0,91	1,18
St	121	22	80,6	62,3	20,16	26,09
Se	346	253	337,9	261,0	0,19	0,25
eSe	90	35	70,5	74,4	5,38	6,96
Mz	3	2	2,8	2,1	0,01	0,01
	1588	1227				

$$\chi^2 = 280,71$$

72 Std.

Mb	4	7	5,5	5,4	0,43	0,44
Pr	198	144	172,5	169,4	3,74	3,81
My	441	569	509,6	500,3	9,24	9,41
eMy	111	114	113,5	111,4	0,05	0,05
Pmo	7	19	13,1	12,8	2,85	2,90
MM	84	69	77,2	75,7	0,59	0,60
St	89	35	62,5	61,4	11,16	11,37
Se	393	361	380,4	373,5	0,41	0,42
eSe	42	31	36,8	36,1	0,72	0,73
Mz	6	0	3,0	2,9	2,91	2,97
	1375	1350				

$$\chi^2 = 64,90$$

Fortsetzung TABELLE D

Granulocytopoese: Patient 3

24 Std.

Zell- typ	B		E		(B-E) ² /E	
	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz
Mb	3	6	4,7	4,2	0,62	0,69
Pr	246	123	193,5	175,4	14,19	15,66
My	484	659	599,6	543,3	22,30	24,61
eMy	65	78	75,0	67,9	1,33	1,47
Pmo	19	24	22,5	20,4	0,56	0,61
MM	88	114	105,9	96,0	3,04	3,36
St	82	49	68,7	62,2	2,56	2,82
Se	562	342	474,2	429,7	16,23	17,91
eSe	39	41	41,9	38,0	0,21	0,23
Mz	10	12	11,5	10,4	0,20	0,22
	1598	1448			$\chi^2 = 128,91$	

48 Std.

Mb	0	2	1,3	0,6	1,39	3,25
Pr	219	60	195,1	83,8	2,91	6,79
My	524	399	645,5	277,4	22,88	53,24
eMy	46	35	56,6	24,3	2,00	4,65
Pmo	33	11	30,7	13,2	0,16	0,37
MM	109	68	123,7	53,2	1,76	4,11
St	64	18	57,3	24,6	0,77	1,79
Se	580	89	467,8	201,1	26,85	62,49
eSe	36	12	33,5	14,4	0,17	0,40
Mz	6	1	4,8	2,1	0,24	0,57
	1617	695			$\chi^2 = 196,89$	

72 Std.

Mb	1	0	0,8	0,1	0,04	0,18
Pr	121	22	116,1	26,8	0,20	0,87
My	300	69	299,7	69,2	0,00	0,00
eMy	44	60	84,4	19,5	19,39	83,90
Pmo	13	1	11,3	2,6	0,23	1,00
MM	72	7	64,1	14,8	0,95	4,13
St	33	0	26,8	6,1	1,43	6,19
Se	242	22	214,4	49,5	3,54	15,32
eSe	23	9	25,9	6,0	0,34	1,49
Mz	12	9	17,0	3,9	1,49	6,48
	861	199			$\chi^2 = 147,26$	

Fortsetzung TABELLE D

Granulocytopoese: Patient 4

24 Std.

Zell- typ	B		E		(B-E) ² /E	
	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz
Mb	3	14	10,2	6,7	5,08	7,62
Pr	246	182	256,8	171,1	0,45	0,68
My	484	445	557,4	371,5	0,68	4,52
eMy	65	90	93,0	61,9	8,43	12,65
Pmo	19	50	41,4	27,5	12,12	18,19
MM	88	86	104,4	69,5	2,58	3,87
St	82	7	53,4	35,5	15,30	22,96
Se	562	145	424,2	282,7	44,72	67,10
eSe	39	35	44,4	29,5	0,65	0,98
Mz	10	11	12,6	8,3	0,53	0,80
	1598	1065			$\chi^2 = 249,02$	

48 Std.

Mb	0	11	5,7	5,2	5,71	6,17
Pr	219	169	201,5	186,4	1,51	1,63
My	524	423	491,9	455,0	2,09	2,26
eMy	46	59	54,5	50,4	1,33	1,44
Pmo	33	30	32,7	30,2	0,00	0,00
MM	109	192	156,3	144,6	14,33	15,49
St	64	90	79,9	74,0	3,19	3,45
Se	580	504	563,0	520,9	0,50	0,55
eSe	36	11	24,4	22,5	5,49	5,94
Mz	6	7	6,7	6,2	0,08	0,09
	1617	1496			$\chi^2 = 71,35$	

72 Std.

Mb	1	0	0,5	0,4	0,27	0,40
Pr	121	70	113,3	77,6	0,51	0,75
My	300	215	305,5	209,4	0,10	0,14
eMy	44	47	53,9	37,0	1,85	2,70
Pmo	13	4	10,0	6,9	0,84	1,22
MM	72	75	87,2	59,7	2,65	3,87
St	33	37	41,5	28,4	1,75	2,56
Se	242	123	216,5	148,4	2,98	4,35
eSe	23	10	19,5	13,4	0,59	0,87
Mz	12	9	12,4	8,5	0,01	0,02
	861	590			$\chi^2 = 28,52$	

Fortsetzung TABELLE D

Granulocytopoese: Patient 5

24 Std.

Zell- typ	B		E		(B-E) ² /E	
	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz
Mb	9	12	10,1	10,8	0,12	0,12
Pr	508	456	465,6	498,3	3,84	3,59
My	314	443	365,6	391,3	7,30	6,82
eMy	80	48	61,8	66,1	5,33	4,98
Pmo	46	51	46,8	50,1	0,01	0,01
MM	42	59	48,7	52,2	0,94	0,88
St	8	9	8,2	8,7	0,00	0,00
Se	55	58	54,5	58,4	10,00	0,00
eSe	7	23	14,4	15,5	3,87	3,61
Mz	14	0	6,7	7,2	7,74	7,23
	1083	1159			$\chi^2 = 56,49$	

48 Std.

Mb	6	6	6,5	5,4	0,04	0,05
Pr	616	332	516,0	431,9	19,34	23,11
My	283	408	376,1	314,8	23,07	27,57
eMy	128	79	112,6	94,3	2,07	2,48
Pmo	44	66	59,8	50,1	4,21	5,03
MM	15	34	26,6	22,3	5,11	6,10
St	5	3	4,3	3,6	0,09	0,11
Se	124	119	132,2	110,7	0,51	0,62
eSe	38	628	25,0	20,9	6,70	0,19
Mz	4	2	3,2	2,7	0,16	0,19
	1263	1057			$\chi^2 = 134,66$	

72 Std.

Mb	14	0	11,4	2,5	0,56	2,53
Pr	384	229	501,9	111,0	27,70	125,21
My	312	23	274,3	60,6	5,18	23,41
eMy	86	23	89,2	19,7	0,11	0,53
Pmo	149	10	130,1	28,8	2,71	12,28
MM	62	0	50,7	11,2	2,48	11,23
St	22	0	18,0	3,9	0,88	3,98
Se	226	4	188,3	41,6	7,53	34,05
eSe	47	0	38,4	8,5	1,88	8,51
Mz	4	0	3,2	0,7	0,16	0,72
	1306	289			$\chi^2 = 271,73$	

Fortsetzung TABELLE D

Granulocytopoese: Patient 6

24 Std.

Zell- typ	B		E		(B-E) ² /E	
	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz	Kontrolle	Zusatz
Mb	12	20	18,8	13,1	2,47	3,53
Pr	463	219	401,2	280,7	9,50	13,58
My	321	311	371,8	260,1	6,94	9,92
eMy	169	157	191,7	134,2	2,70	3,87
Pmo	142	32	102,3	71,6	15,34	21,92
MM	50	42	54,1	37,8	0,31	0,44
St	15	2	10,0	6,9	2,49	3,57
Se	72	50	71,7	50,2	0,00	0,00
eSe	22	34	32,9	23,0	3,63	5,19
	229	867			$\chi^2 = 105,49$	

48 Std.

Mb	14	4	8,8	9,1	3,02	2,91
Pr	336	213	269,3	279,6	16,49	15,88
My	184	412	292,4	303,5	40,19	38,71
eMy	167	157	158,9	165,0	0,40	0,39
Pmo	125	32	77,0	79,9	29,87	28,77
MM	32	65	47,5	49,4	5,10	4,91
St	3	4	3,4	3,5	0,05	0,05
Se	65	78	70,1	72,8	0,37	0,36
eSe	32	40	35,3	36,7	0,31	0,30
Mz	10	0	4,9	15,0	5,28	5,09
	968	1005			$\chi^2 = 198,54$	

72 Std.

Mb	2	3	2,9	2,0	0,28	0,40
Pr	233	132	212,9	152,0	1,87	2,63
My	251	339	344,2	245,7	25,28	35,42
eMy	178	115	170,9	122,0	0,28	0,40
Pmo	112	21	77,6	55,3	15,23	21,34
MM	64	58	71,1	50,8	0,72	1,01
St	12	3	8,7	6,2	1,20	1,68
Se	160	73	135,9	97,0	4,24	5,95
eSe	58	26	49,0	34,9	1,64	2,30
Mz	9	0	5,2	3,7	2,67	3,74
	1079	770			$\chi^2 = 128,39$	

c) Mitoseindex

Der Mitoseindex ist das Verhältnis zwischen der Anzahl aller Mitosen und der Gesamtzahl der teilungsfähigen Zellen. In der Erythrocytopoese gelten alle Blasten außer den reifen Erythroblasten, in der Granulocytopoese die Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten und Metamyelocyten als teilungsfähig.

Die Mitoseindices (Tabelle E, F) zeigten in der Erythrocytopoese, daß in den Kontrollkulturen erst nach 72 Stunden, in den Zusatzkulturen aber bereits nach 48 Stunden nur noch in einem Fall Mitosen vorkamen. Dies würde auf eine verringerte Regeneration in den Zusatzkulturen hinweisen. In der Granulocytopoese war bei allen Patienten der Mitoseindex in den Zusatzkulturen bei 48 Stunden einheitlich erniedrigt.

Da in den Kontrollkulturen nur insgesamt 25 rote und 129 weiße Mitosen, in den Zusatzkulturen 17 rote und 95 weiße Mitosen gezählt wurden, war es sinnvoll, nur eine gesamtgraphische Darstellung zu zeichnen. (Abb.7) Hier zeigte sich sowohl in der Erythrocytopoese als auch in der Granulocytopoese nach 48 Stunden ein markanter Abfall bei den Zusatzkulturen gegenüber den Kontrollkulturen.

Die Signifikanzberechnung erstreckte sich auf die Steigung der Kontroll- und Zusatzkurven der Mitoseindices (Abb.7) und auf den Unterschied zwischen Kontrolle und Zusatz (Tab. G - K).

Für die Granulocytopoese konnte eine signifikante Steigung und für den 48-Stundenwert ein signifikanter Unterschied berechnet werden. Für die Erythrocytopoese konnten keine signifikanten Werte errechnet werden.

TABELLE E

Mitose-Indices der Erythrocytopoese in % angegeben:

	Original- präparat	Kontrollen			Zusätze D-2, G-2		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Patient 1	18,0	8,0	20,8	4,6	6,0	0	0
Patient 2	2,4	3,7	10,5	0	0	0	0
Patient 3	14,0	0	5,5	0	5,8	10,0	0
Patient 4	14,0	0	5,5	0	2,0	0	0
Patient 5	13,0	2,3	4,1	0	3,1	0	0
Patient 6	26,2	2,3	1,6	0	6,0	0	0
Arithme- tisches Mittel	14,6	2,7	8,0	0,8	3,8	1,4	0

TABELLE F

Mitose-Indices der Granulocytopoese in % angegeben:

	Original- präparat	Kontrollen			Zusätze D-2, G-2		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Patient 1	25,0	15,0	9,8	5,4	15,5	1,5	8,5
Patient 2	10,7	11,5	16,5	4,7	7,0	2,2	6,5
Patient 3	21,6	5,5	9,7	7,2	1,0	1,7	0
Patient 4	21,6	5,5	9,7	7,2	4,6	1,1	2,4
Patient 5	6,6	8,0	10,0	1,0	20,6	1,1	14,0
Patient 6	14,5	17,6	10,5	2,4	24,3	7,9	7,5
Arithme- tisches Mittel	16,6	10,5	11,0	4,6	12,0	2,6	6,5

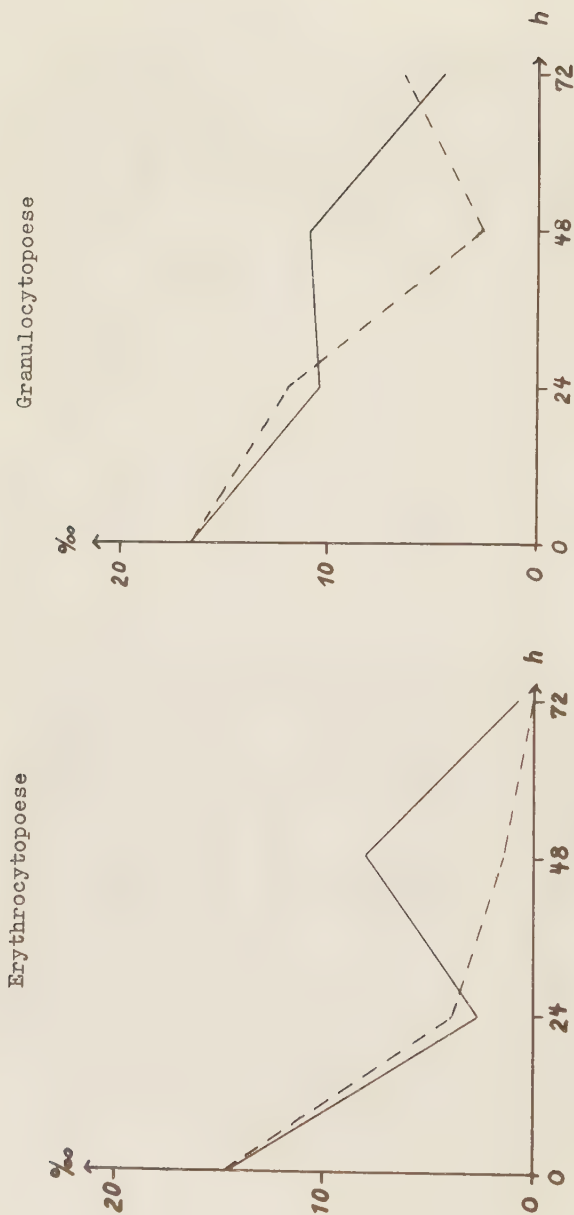


Abb.7 Mitoseindizes der Erythro- und Granulocytopoese

Abszissen: Zeit in Stunden.
 Ordinaten: roter Mitoseindex (rM - I) bzw. weißer Mitoseindex (wM - I).
 — = Kontrollkulturen, - - - - - = Zusatzkulturen
 Den Berechnungen lagen 42 rote und 224 weiße Mitosen zugrunde.
 Erläuterungen siehe Seite 34.

TABELLE G

Berechnung der Mitoseindices auf Stetigkeit.

Für die Auswertung auf Stetigkeit wurden zwei Freiheitsgrade berücksichtigt. Bei $\chi^2 > 12$ sind die Werte signifikant.

Erythrocytopoese: Kontrollwerte

B		E		(B-E) ² /E	
Mitosen	Gesamtzellzahl	Mitosen	Gesamtzellzahl	Mitosen	Gesamtzellzahl
24 h 10	2846	12,1	2845,9	0,36	0,00
48 h 13	1958	8,3	1968,6	2,59	0,01
72 h 2	1081	4,6	1080,4	1,45	0,00
		Nichtmitotische Zellen			
25	5860			$\chi^2 = 4,43$	

Erythrocytopoese: Zusätze D-2, G-2

B		E		(B-E) ² /E	
Mitosen	Gesamtzellzahl	Mitosen	Gesamtzellzahl	Mitosen	Gesamtzellzahl
24 h 15	3123	11,2	3126,7	1,27	0,00
48 h 1	1066	3,8	1063,1	2,07	0,00
72 h 1	567	2,0	565,9	0,52	0,00
		Nichtmitotische Zellen			
17	4739			$\chi^2 = 3,88$	

TABELLE H

Berechnung der Mitoseindices auf Stetigkeit.

Granulocytopoese: Kontrollwerte

B		E		(B-E) ² /E	
Mitosen	Gesamtzellzahl	Mitosen	Gesamtzellzahl	Mitosen	Gesamtzellzahl
24 h 55	4780	44,6	4790,3	2,39	0,02
48 h 60	5381	50,2	5390,7	1,88	0,01
72 h 14	3805	35,2	3783,7	12,83	0,11
Nichtmitotische Zellen					
129	13837			$\chi^2 = 17,27$	

Granulocytopoese: Zusätze D-2, G-2

B		E		$(B-E)^2/E$	
Mitosen	Gesamtzellzahl	Mitosen	Gesamtzellzahl	Mitosen	Gesamtzellzahl
24 h 59	5024	34,8	5048,1	16,82	0,11
48 h 14	5701	39,1	5675,8	16,13	0,11
72 h 22	3150	21,7	3150,2	0,00	0,00
Nichtmitotische Zellen					
95	13780			$\chi^2 = 33,19$	

TABELLE J

Berechnung der Mitoseindices auf Unterschied.

Für die Auswertung auf Unterschied wurde ein Freiheitsgrad berücksichtigt. Signifikante Werte ergeben sich für $\chi^2 > 9$.

Erythrocytopoese: 24 Std.

	B		E		(B-E) ² /E	
	Mito-sen	Gesamt-zellzahl	Mito-sen	Gesamt-zellzahl	Mito-sen	Gesamt-zellzahl
Kontrolle	10	2864	12,0	2861,9	0,33	0,00
Zusätze	15	3123	13,1	3124,8	0,27	0,00
Nichtmit.Z.						
	25	5962			$\chi^2 = 0,61$	

Erythrocytopoese: 48 Std.

	B		E		(B-E) ² /E	
	Mito-sen	Gesamt-zellzahl	Mito-sen	Gesamt-zellzahl	Mito-sen	Gesamt-zellzahl
Kontrolle	13	1958	9,1	1969,8	1,64	0,00
Zusätze	1	1066	4,9	1062,0	3,14	0,01
Nichtmit.Z.						
	14	3010			$\chi^2 = 4,81$	

Erythrocytopoese: 72 Std.

	B		E		(B-E) ² /E	
	Mito-sen	Gesamt-zellzahl	Mito-sen	Gesamt-zellzahl	Mito-sen	Gesamt-zellzahl
Kontrolle	2	1081	1,9	1081,0	0,0	0,0
Zusätze	1	567	1,0	566,9	0,0	0,0
Nichtmit.Z.						
	3	1645			$\chi^2 = 0,001$	

TABELLE K

Berechnung der Mitoseindizes auf Unterschied.

Granulocytopoese: 24 Std.

	B		E		(B-E) ² /E	
	Mito- sen	Gesamt- zellzahl	Mito- sen	Gesamt- zellzahl	Mito- sen	Gesamt- zellzahl
Kontrolle	55	4780	61,1	4773,8	0,61	0,00
Zusätze	59	5024	64,2	5018,7	0,43	0,00
<u>Nichtmit.Z.</u>						
	114	9690			$\chi^2 = 1,06$	

Granulocytopoese: 48 Std.

	B		E		(B-E) ² /E	
	Mito- sen	Gesamt- zellzahl	Mito- sen	Gesamt- zellzahl	Mito- sen	Gesamt- zellzahl
Kontrolle	60	5381	36,3	5410,2	15,46	0,15
Zusätze	14	5701	38,3	5710,3	15,40	0,01
<u>Nichtmit.Z.</u>						
	74	11008			$\chi^2 = 31,02$	

Granulocytopoese: 72 Std.

	B		E		(B-E) ² /E	
	Mito- sen	Gesamt- zellzahl	Mito- sen	Gesamt- zellzahl	Mito- sen	Gesamt- zellzahl
Kontrolle	14	3805	19,7	3799,2	1,68	0,00
Zusätze	22	3150	16,4	3155,5	1,89	0,00
<u>Nichtmit.Z.</u>						
	36	6919			$\chi^2 = 3,59$	

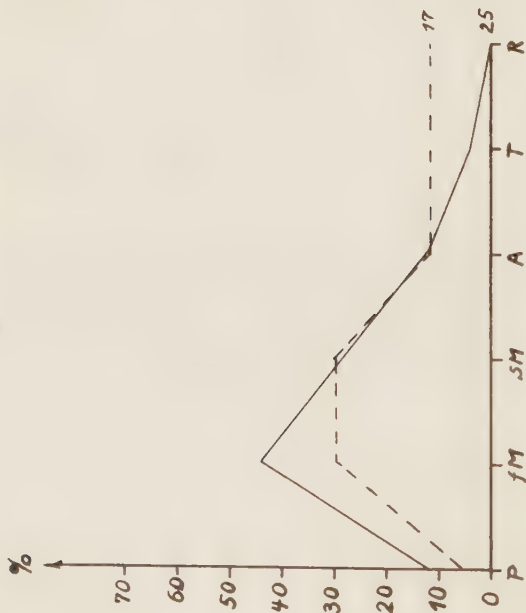
d) Karyologische Kurven

Um eventuelle Änderungen in der Häufigkeit einzelner Mitosephasen in den Zusatzkulturen festzustellen, wurden karyologische Kurven angefertigt (Abb. 8), die die prozentuale Verteilung der einzelnen Mitosephasen darstellen. Wegen der geringen Anzahl der Mitosen wurde wiederum nur eine Summenkurve aller Patienten getrennt für die Erythro- und Granulocytopoese angefertigt.

In der Erythrocytopoese zeigte sich bei den Zusatzkulturen eine Abnahme der Prophasen und der frühen Metaphasen bei Zunahme der Telo- und Rekonstruktionsphasen.

In der Granulocytopoese fand sich durch den Zusatz eine leichte Verlagerung von früher Metaphase auf späte Metaphase.

Erythrocytopoese



Granulocytopoese

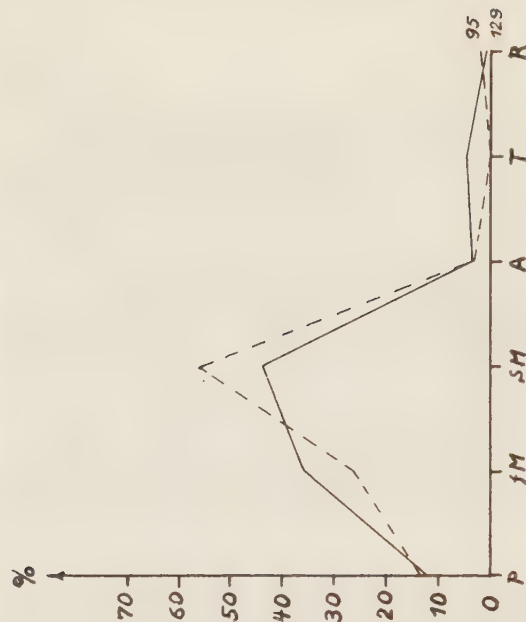


Abb. 8 Karyologische Kurven der Erythro- und Granulocytopoese
Summenkurve aller Patienten

Abszissen: Mitosephasen
Ordinaten: Häufigkeit der Mitosephasen in %.
—— = Kontrollkulturen, ----- = Zusatzkulturen
Den Berechnungen lagen 42 rote und 224 weiße Mitosen zugrunde.
Zeichenerklärung siehe Seite 10, Erläuterungen siehe Seite 41

e) G/E - Index

Unter dem G/E-Index versteht man das Verhältnis zwischen der Zellanzahl der Granulocytopoese und der Erythrocytopoese. Er gilt in den Kulturen als Zeichen der Ausreifung der Erythrocytopoese.

Bei den Patienten 1, 2, 3, 4 und 6 lagen Anämien verschiedener Genese vor, so daß in den Originalausstrichen die G/E-Indices entsprechend der Reaktion des Knochenmarks erniedrigt waren (Verschiebung zur roten Reihe).

Bei den Patienten 1, 2 und 5 lagen die G/E-Indices nach 24 Stunden unter den Originalwerten, bei 48 und 72 Stunden unterschiedlich über und unter den Originalen. Die Patienten 3, 4 und 6 zeigen einheitlich in allen Kontrollen höhere Indices als die Originale. In den Zusatzkulturen liegen die Indices bis auf Patient 5 einheitlich unter den Kontrollwerten, das heißt, daß die Erythrocytopoese vermehrt ist. Bei Patient 5 liegen die G/E-Indices höher.

Die Mittelwerte zeigen bis 48 Stunden eine fallende Tendenz. Dies läßt auf eine Reifungshemmung oder Entkernungsstörung der Erythrocytopoese schließen. Nach 72 Stunden steigt der Index, was für eine Ausreifung der Erythrocytopoese spricht.

TABELLE L

G/E - Indices

	Original- präparat	Kontrollen			Zusätze D-2,G-2		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h
Patient 1	1,96	1,59	2,15	1,68	0,48	0,75	1,31
Patient 2	3,28	1,84	6,28	18,6	4,45	2,78	8,04
Patient 3	1,8	3,88	3,79	2,84	3,12	2,65	-
Patient 4	1,8	3,88	3,79	2,84	1,77	3,65	1,8
Patient 5	2,25	1,08	1,78	2,48	3,0	1,5	26,0
Patient 6	1,18	2,0	1,13	1,85	0,71	0,97	1,21
Arithme- tisches Mittel	2,04	2,37	3,15	5,04	2,25	2,05	7,67

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

1. Die Fraktionen beider Patienten mit Banti-Syndrom - mit und ohne Lebercirrhose - zeigten die gleiche Wirkung auf menschliches Knochenmark in vitro.
2. In den Reifungskurven war für die Erythrocytopoese eine ausgeprägte, hochsignifikante Reifungsförderung (bei gleichzeitiger Lebercirrhose allerdings stärker) zu erkennen, von der besonders die oxyphilen und reifen Erythroblasten erfaßt wurden.
In der Granulocytopoese zeigte sich eine leichte, aber signifikante Reifungshemmung besonders bei den Metamyelocyten, stab- und segmentkernigen Granulocyten.
3. Der Mitoseindex wies durch den Zusatz in der Erythrocytopoese ab 48 Stunden auf eine verringerte Regeneration hin. In der Granulocytopoese zeichnete sich bei 48 Stunden in den Zusatzkulturen eine einheitliche signifikante Hemmung ab.
4. Die karyologischen Kurven der Erythro- und Granulocytopoese zeigten keine eindeutigen Veränderungen.
5. Die G/E-Indices wiesen in den Zusatzkulturen im Vergleich zu den Kontrollen bei den fünf Anämien bis 48 Stunden geringere Werte auf, was einer Reifungshemmung oder Entkernungsstörung der Erythrocytopoese entspricht, wenn nicht eine erhebliche Destruktion der Zellen der Granulocytopoese als Ursache angenommen werden muß. Nach 72 Stunden kam die in den Reifungskurven ausgeprägte Reifungsförderung auch im G/E-Index zum Tragen.

DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit führt die Untersuchungen über die Einwirkung von Extrakten hypersplener Milzen auf menschliches Knochenmark fort, die von ALBERT (1, 2) 1962/63 und BOLL (8) 1970 begonnen hatten.

In den Voruntersuchungen wurden Seren von Patienten mit Banti-Syndrom auf Knochenmarkkulturen appliziert, was in der Granulocytopoese eine starke Reifungshemmung zur Folge hatte, während die Erythrocytopoese nicht beeinflusst wurde (20). Auf dem Weg, einen vermuteten hormonalen Milzfaktor zu isolieren, wurde eine gegen NaCl dialysierte Ammonsulfatfällung des Serums auf Knochenmarkkulturen angesetzt.

Dieses Dialysat von zwei Patienten mit hypersplenischen Milzen zeigte in den Reifungskurven nicht die Wirkung einer starken Hemmung der Granulocytopoese, wie es das Gesamtserum hervorgerufen hatte. Die untersuchte Fraktion wirkte nur schwach hemmend auf die Reifung der Granulocytopoese, aber stark aktivierend auf die Reifung der Erythrocytopoese.

Die zur Beurteilung der Regeneration berechneten Mitoseindices wiesen unter Zusatz bereits nach 48 Stunden auf eine verringerte Regeneration der Erythrocytopoese hin. Da es in der Erythrocytopoese neben einer ab 24 Stunden signifikanten Reifungsförderung ab 48 Stunden auch zu einer Regenerationshemmung mit entsprechender Erniedrigung des Mitoseindex kommt, zeigt sich keine einheitliche Wirkung auf die Proliferation der Erythrocytopoese. Die Mitoseindices in der Granulocytopoese nahmen nach 48 Stunden auch einheitlich ab. Hier kann man ähnlich wie bei der Reifung von einer - allerdings später einsetzenden - Regenerationshemmung und damit von einer Beeinträch-

tigung der gesamten Proliferation der Granulocytopoese sprechen.

Die karyologischen Kurven zeigen eine graphisch darstellbare Abnahme der frühen Metaphasen zugunsten späterer Phasen. Durch das Sammeldiagramm werden kurzfristige Regenerationsänderungen ausgeschlossen (7).

Die unter dem Begriff der splenogenen Markhemmung bekannten Veränderungen der Differentialverteilung des Knochenmarks kann als eine Proliferationshemmung der Granulo- und der Erythrocytopoese gedeutet werden (BOLL). Aufgrund unserer Untersuchungen ist anzunehmen, daß es mindestens zwei Wirkgruppen splenaler Herkunft gibt, die durch die Fraktionierung teilweise getrennt wurden. In der durch NaCl dialysierten Ammonsulfatfällung zeigte sich neben einer gegen das Vollserum abgeschwächten proliferationshemmenden Wirkung auf die Granulocytopoese noch ein Faktor, der die Reifung der Erythrocytopoese fördert. Die humorale Wirkgruppe aus hypersplenischen Milzen besteht danach aus sich gegenseitig beeinflussenden Aktivierungs- und Hemmfaktoren, die unterschiedlich auf die Proliferation der Erythro- und Granulocytopoese wirken.

ZUSAMMENFASSUNG

Dialysate von Ammonsulfatfällung aus Serum zweier Patienten mit Banti-Syndrom wurden auf menschliches Knochenmark appliziert, das in Kulturen bis 72 Stunden ohne diese Zusätze aufgrund von Differentialzählungen verglichen wurde. Aus den Kultur-
ausstrichen nach je 24 Stunden wurden je 2000 Zellen differenziert, die Mitose- und G/E-Indices ermittelt, schließlich Reifungs- und karyologische Kurven angefertigt und die Signifikanz berechnet.

In Abweichung von Voruntersuchungen mit nichtfraktionierten Seren der gleichen Patienten zeigte sich eine geringere Proliferationshemmung der Granulocytopoese und eine Beeinflussung der Erythrocytopoese in Form einer Aktivierung der Reifung.

Aufgrund unserer Untersuchungen ist anzunehmen, daß es mehrere Wirkgruppen splenaler Herkunft im Serum der Patienten mit unterschiedlicher Wirkung auf die Proliferation der Erythro- und Granulocytopoese geben muß.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) v. ALBERT, H.-H.

Hemmwirkung eines Extraktes aus einer menschlichen
Hyperspleniemilz in der Knochenmarkkultur.

Klin. Wschr. 40, 211 (1962)

- 2) v. ALBERT, H.-H., ZICKGRAF, H.

Zur Frage einer depressorischen Knochenmarkwirkung
"hypersplener" Milzen.

II. Experimentelle Untersuchungen an der Flüssig-
keitskultur.

Blut, 12, 104 (1966)

- 3) BEGEMANN, H. und H.-G. HARWERTH

Klinische Hämatologie

Georg Thieme Verlag - Stuttgart (1970)

- 4) BELITZ, H. J.

Die Anwendung statistischer Methoden in der
Biologie.

in: Der Mathematikunterricht (3/1960)

Ernst Klett Verlag, Stuttgart

- 5) BOCK, H.-E., FRENZEL, B.

Splenogene Knochenmarkhemmung

Klin. Wschr. 17, 1315 (1938)

- 6) BOLL, I.

Granulocytopoese unter normalen und pathologischen
Bedingungen.

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966)

- 7) BOLL, I.
Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen Granulocytopoese.
Folia haemat. (Lpz.) 91, 172 (1969)
- 8) BOLL, I., E. BAUCKS
Das Knochenmark beim Milztumor und seine Kinetik nach dem Verhalten in der 3-Tage-Kultur.
Die Milz, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 355 (1970)
- 9) BOLL, I. und G. FUCHS
Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro.
Blut 7, 257 (1961)
- 10) BOLL, I. und G. MERSCH
Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythrocytopoese in vitro.
Blut 17, 193 (1968)
- 11) BOLL, I. und G. MERSCH
Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulocytopoese in vitro.
Blut 19, 257 (1969)
- 12) DAMESHEK, W., ESTREN, S.
The Spleen and Hypersplenism.
Grune-Stratton, New York, 1947
- 13) GOSTOMZYK, J.G., FEESER, C., RUHENSTROTH-BAUER, G.
Humorale Stimulierung der Ausschwemmung von Granulocyten aus dem Knochenmark durch die Milz.
Klin. Wschr. 42, 231 (1964)

- 14) HEILMEYER, L.
Blut und Blutkrankheiten
Hdb. Inn. Med., 2. Bd., 894, Berlin-Göttingen-
Heidelberg, 1951

- 15) HITTMAIR, A.: HEILMEYER'HITTMAIR
Handbuch der gesamten Hämatologie, Bd. 5/2.
Urban und Schwarzenberg, München-Berlin-Wien (1969)

- 16) KAISER, E. und W. RINDT
Milz und Endokrinium
Med. Klin. 60, 985 (1965)

- 17) LENNERT, K., HARMS, D.
Rundtischgespräch in: Die Milz
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 419 (1970)

- 18) ROHR, K.
Das menschliche Knochenmark
Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1960)

- 19) RUHENSTROTH-BAUER, G.
The role of humoral splenic factors in the formation
and release of blood cells.
Sem. Hémat. 2, 229 (1965)

- 20) SCHULZ, R. M.
Die Wirkung von Serum bei Splenomegalie - Patienten
auf die Proliferation von menschlichem Knochenmark
in vitro.
Dissertation in Vorbereitung

- 21) STREICHER, H.J. und P.H. SCHMIDT
Die Knochenmarkfunktionsprüfung unter besonderer
Berücksichtigung der Milzexstirpation.
Klin. Wschr. 40, 667 (1962)

22) WEINREICH, J.

Milz und Leber in ihrem Einfluß auf das Blutbild.
Untersuchungsergebnisse zum Problem des "Hyper-
splenismus".

Acta hepato-splenol., X, 81 (1963)

Für die Themenstellung und die ständige Betreuung dieser Arbeit möchte ich Frau Professor Dr. med. I. Boll sehr herzlich danken. Durch ihre Unterstützung bei der Einarbeitung und ihre fortwährende fachliche Beratung hat sie mir sehr geholfen.

Die Fraktionierung der Seren übernahm Herr Professor Dr. G. Ruhenstroth-Bauer, Max-Planck-Institut für Biochemie, München. Ihm gilt dafür ein besonderer Dank.

Für die Beratung und Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse danke ich Herrn Professor Dr. H.-J. Belitz, Genetisches Institut der Freien Universität, Berlin.

Meinem Vater Gerhard Siegfried danke ich für seine verständnisvolle Hilfe bei der Gestaltung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 23. Juli 1947 wurde ich, Eberhard Siegfried, als Sohn des Ingenieurs Gerhard Siegfried und seiner Ehefrau Brigitte, geb. Konitz in Großwig, Kreis Wittenberg, geboren. 1949 zogen wir nach Berlin Siemensstadt um. Von 1954 bis 1960 besuchte ich die Robert-Reinick-Schule in Siemensstadt und anschließend die Carl-Friedrich-von-Siemens-Schule, wissenschaftlicher Zweig, mathemat.-naturwiss. Zug, auf der ich 1967 die Reifeprüfung abgelegt habe.

Seit dem Sommer-Semester 1967 studierte ich an der Freien Universität, Berlin, Zahnmedizin.

Am 11.3.1968 bestand ich ebenda die naturwissenschaftliche, am 13.10.1969 die Vorprüfung für Zahnmediziner und am 21.7.1972 das zahnärztliche Staatsexamen.

